

DELPHION

No active trail

Select CR

Stop

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#)

View: Jump to:

☐ Email this

🔍 Title: **FR2780059A1: PROCEDE DE MARQUAGE D'UN ACIDE RIBONUCLEIQUE FRAGMENTS D'ARN MARQUES AINSI OBTENUS**

🔍 Derwent Title: Labeling RNA useful as probes for medical diagnosis [\[Derwent Record\]](#)

🔍 Country: FR France

🔍 Kind: A1 Application, First Publication ¹ (See also: [FR2780059B1](#))

🔍 Inventor: LAAYOUN ALI;

🔍 Assignee: BIO MERIEUX France
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

🔍 Published / Filed: 1999-12-24 / 1998-06-17

🔍 Application Number: FR1998000007870

🔍 IPC Code: IPC-7: [C07H 21/02](#); [C12Q 1/68](#); [G01N 33/58](#);

🔍 ECLA Code: C07H21/00G;









🔍 Priority Number: 1998-06-17 FR1998000007870

🔍 INPADOC Legal Status: None [Get Now: Family Legal Status Report](#)

🔍 Designated Country: AE AL AM AP AZ BA BB BG BR BY CA CN CU CZ EA EE GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE

🔍 Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	WO9965926A1	1999-12-23	1999-06-17	METHOD FOR MARKING A RIBONUCLEIC ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS
	US20020187500A1	2002-12-12	2002-03-20	Process for labeling a ribonucleic acid
	US6921640	2005-07-26	2002-03-20	Process for labeling a ribonucleic acid
	US6376179	2002-04-23	1999-12-17	Process for labeling a ribonucleic acid, and labeled RNA fragments which are obtained thereby
<input checked="" type="checkbox"/>	JP2002517994T2	2002-06-25	1999-06-17	
<input checked="" type="checkbox"/>	FR2780059B1	2002-10-11	1998-06-17	PROCEDE DE MARQUAGE D'UN ACIDE RIBONUCLEIQUE ET FRAGMENTS D'ARN MARQUES AINSI OBTENUS
<input checked="" type="checkbox"/>	FR2780059A1	1999-12-24	1998-06-17	PROCEDE DE MARQUAGE D'UN ACIDE RIBONUCLEIQUE ET FRAGMENTS D'ARN MARQUES AINSI OBTENUS
	EP1260597A3	2003-01-08	1999-06-17	Process for labeling a nucleic acid, including purification, and labeled RNA fragments obtained by this process
	EP1260597A2	2002-11-27	1999-06-17	Process for labeling a nucleic acid, including purification, and labeled RNA fragments obtained by this process
				Process for labeling a ribonucleic acid, in

	EP1260596A3	2003-10-29	1999-06-17	optional signal amplification, and labeled fragments which are obtained by this pro
	EP1260596A2	2002-11-27	1999-06-17	Process for labeling a ribonucleic acid, in optional signal amplification, and labeled fragments which are obtained by this pro
	EP1087983A1	2001-04-04	1999-06-17	METHOD FOR MARKING A RIBONUCL ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS
	CN1310722T	2001-08-29	1999-06-17	Method for marking a ribonucleic acid and resulting marked RNA fragments
	CN1310722A	2001-08-29	1999-06-17	Method for marking a ribonucleic acid and resulting marked RNA fragments
	CA2335730AA	1999-12-23	1999-06-17	METHOD FOR MARKING A RIBONUCL ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS
	AU4269299A1	2000-01-05	1999-06-17	METHOD FOR MARKING A RIBONUCL ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS
	AU0750475B2	2002-07-18	1999-06-17	METHOD FOR MARKING A RIBONUCL ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS
17 family members shown above				

Other Abstract
Info:

CHEMABS 132(04)031747X [DERABS C2000-116762](#)



[Nominate this for the Gallery...](#)



Copyright © 1997-2006 The Thomson

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) |

①9) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1) N° de publication : **2 780 059**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1) N° d'enregistrement national : **98 07870**

⑤1) Int Cl⁶ : C 07 H 21/02, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/58

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2) Date de dépôt : 17.06.98.

③0) Priorité :

⑦1) Demandeur(s) : *BIO MERIEUX Société anonyme —*
FR.

⑦2) Inventeur(s) : LAAYOUN ALI.

④3) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 24.12.99 Bulletin 99/51.

⑤6) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du*
présent fascicule

⑥0) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦3) Titulaire(s) :

⑦4) Mandataire(s) : GERMAIN ET MAUREAU.

⑤4) PROCEDE DE MARQUAGE D'UN ACIDE RIBONUCLEIQUE ET FRAGMENTS D'ARN MARQUES AINSI
OBTENUS.

⑤7) La présente invention concerne un procédé de mar-
quage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou natu-
rel. Elle concerne également des fragments d'ARN marqués
selon le procédé, ainsi que leur utilisation.

Ce procédé consiste :

- à fragmenter l'ARN, et
- à marquer l'extrémité 3' et / ou 5' de chaque fragment
dudit ARN.

L'invention trouve une application préférentielle dans le
domaine du diagnostic médical.

FR 2 780 059 - A1



DESCRIPTION

La présente invention concerne un nouveau procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel.

5 *L'état de la technique montre que de nombreuses méthodes existent pour marquer des nucléotides, des oligonucléotides ou des acides nucléiques ; les oligonucléotides et les acides nucléiques seront désignés par le terme polynucléotides. En ce qui concerne les oligonucléotides, le marquage peut s'effectuer soit lors de la synthèse, soit par incorporation d'au moins un nucléotide marqué. La première*
10 *méthode consiste à fixer le marqueur sur la base, que celle-ci soit naturelle ou modifiée. La deuxième méthode propose de fixer le marqueur sur le sucre, là encore qu'il soit naturel ou modifié. La troisième méthode a pour objet la fixation du marqueur sur le phosphate.*

15 *La marquage sur la base a été notamment utilisé dans l'approche de marquage des acides nucléiques par incorporation de nucléotides directement marqués.*

Le marquage sur le sucre est souvent utilisé dans le cas des sondes nucléiques préparées par synthèse chimique.

Le marquage sur le phosphate a été aussi utilisé pour introduire des bras fonctionnalisés et des marqueurs lors de la synthèse chimique des polynucléotides.

20 *En fait l'homme du métier, qui doit effectuer un marquage d'un nucléotide ou d'un acide nucléique, est enclin à effectuer cette fixation sur la base ou sur le sucre qui lui offrent plus de commodité et d'alternative. C'est d'ailleurs ce qui ressort de l'étude de nombreux documents, tels que EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5,449,767, US-A-5,328,824 pour la base ou EP-A-0.286.898*
25 *pour le sucre.*

 Néanmoins, ces techniques ont certains inconvénients, dont les deux principaux sont la gêne stérique et l'influence engendrées par la présence d'un marqueur.

 Dans le cas d'un marquage effectué sur la base, la gêne stérique est due à l'empiétement du marqueur sur l'espace où est présente une base voisine, que cette base
30 voisine soit portée par un nucléotide adjacent du même brin ou par le brin

complémentaire. Il est assez évident également que la présence du marqueur sur la base peut gêner l'efficacité et la spécificité, lors de l'incorporation enzymatique, et peut influencer la qualité des liaisons hydrogènes entre les deux brins complémentaires, ce qui peut nuire à l'hybridation.

5 Dans le cas d'un marquage sur le sucre, la gêne stérique est due à l'empiétement du marqueur sur l'espace où est présent un sucre adjacent porté par le même brin. Cette présence du marqueur peut éloigner deux bases adjacentes portées par le même brin et empêcher, par la suite, la bonne hybridation avec le brin complémentaire, du fait que les liaisons hydrogènes ne sont pas optimales entre les brins.

10 *La fixation du marqueur sur le phosphate est une technique plus complexe que la technique consistant à fonctionnaliser la base ou le sucre.*

Pourtant dans certains documents, ont été proposées des techniques de marquage du phosphate. C'est par exemple le cas avec le document EP-A-0.280.058, qui décrit le marquage d'un nucléotide par fixation du marqueur sur le phosphate, ce
15 *dernier étant fixé sur le sucre en position 2' et/ou 5' quand le nucléotide est un désoxyribonucléotide, et en position 2', 3' et/ou 5' quand le nucléotide est un ribonucléotide. Il décrit également un polynucléotide ou oligonucléotide qui comprend au moins un nucléotide marqué comme décrit ci-dessus ; ce nucléotide est incorporé dans le polynucléotide ou l'oligonucléotide lors de la synthèse.*

20 Toutefois, le marquage, proposé par le document EP-A-0.280.058, ne permet pas d'obtenir un marquage uniforme des acides nucléiques. En effet, l'incorporation des nucléotides marqués dans les polynucléotides ou les oligonucléotides ne peut pas être contrôlée, il dépend entièrement de la composition du polynucléotide ou de l'oligonucléotide qui sera synthétisé. Ainsi certains polynucléotides ou oligonucléotides
25 peuvent contenir de nombreux nucléotides marqués alors que d'autres peuvent ne pas en contenir du tout. L'intensité du signal émis par ces acides nucléiques ne sera donc pas uniforme, ce qui risque de rendre l'interprétation des résultats difficile lors de leur détection.

Dans ce cas, le marquage est un marquage biologique par incorporation, où l'on
30 ne contrôle pas la position des nucléotides marqués.

De plus, le marquage est réalisé sur des acides nucléiques de grandes tailles. En effet, aucune phase de clivage, n'a été décrite avant les étapes de marquage. Ainsi, lorsque l'on hydrolyse ces acides nucléiques cibles sur des sondes de capture, les duplex formés après hybridation avec les acides nucléiques cibles ne sont pas stables. C'est également le cas lorsque les polynucléotides sont utilisés en tant que sondes de 5 détection. Les raisons peuvent être dues à la gêne stérique ou au manque de spécificité entre le polynucléotide ou l'oligonucléotide, qui a été synthétisé, et sa cible qui n'est pas forcément de même taille. Il va donc y avoir une perte quantitative et qualitative du signal.

La gêne stérique peut être le fait, non seulement, de la longueur de l'acide 10 nucléique, mais également de l'existence ou de la conservation de structures secondaires. Le clivage permet de détruire ces structures et ainsi d'optimiser l'hybridation. Cette gêne stérique joue un rôle particulièrement important dans le cas de l'hybridation sur des surfaces contenant des sondes de capture à forte densité, par 15 exemple les puces à ADN mises au point par la société Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Shee et al., Science, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis", A. Caviani Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026). Dans cette technologie, les sondes de capture sont généralement de tailles réduites, autour de vingt nucléotides.

20 *En ce qui concerne le clivage des acides nucléiques, de nombreuses méthodes sont décrites dans l'état de la technique.*

Premièrement, le clivage peut être enzymatique, c'est-à-dire que la fragmentation des acides nucléiques peut être réalisée par des nucléases (DNases ou RNases). On génère alors des fragments de petites tailles avec des extrémités 3'-OH, 25 5'-OH, 3'-phosphate, 5'-phosphate.

Deuxièmement, le clivage peut être chimique. Par exemple dans le cas des ADN, on peut effectuer la dépurination ou la dépyrimidination des ADN, qui sont alors clivés en présence d'une base par un mécanisme dit de « β -élimination ». Le clivage des ADN peut être réalisé par des mécanismes d'oxydation, d'alkylation, d'addition de radicaux 30 libres entre autres. Pour cliver les ARN, on utilise des cations métalliques souvent

associés à des molécules organiques utilisées comme catalyseurs chimiques, par exemple l'imidazole. Ce clivage est préférentiellement réalisé en milieu alcalin et génère des fragments avec des extrémités 3'-phosphate.

Cependant, ces clivages n'ont pas pour objet de faciliter ou de permettre le
5 marquage. Aucun procédé de clivage avant marquage en une ou deux étapes n'a été décrit dans l'art antérieur.

La présente invention propose donc un procédé qui pallie les inconvénients
précédemment cités. En effet, il permet d'obtenir un marquage uniforme des fragments
d'ARN, dès le clivage terminé. De plus, le clivage permet d'obtenir des fragments
10 d'une taille optimale pour une éventuelle hybridation. L'hybridation étant de meilleure
qualité, la révélation de cette hybridation sera plus rapide et efficace.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé de marquage d'un acide
ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à fragmenter l'ARN, et
- 15 - à marquer l'extrémité 3' et/ou 5' de chaque fragment dudit ARN.

Selon un mode préférentiel de fonctionnement, le marquage de l'extrémité 3' de
chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment
constituant l'extrémité 3' et/ou 5' de l'ARN de départ, et/ou le marquage de l'extrémité
5' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du
20 fragment constituant l'extrémité 5' de l'ARN de départ.

Selon un premier mode de réalisation, la fragmentation et le marquage
s'effectue en une étape.

Selon un second mode de réalisation, la fragmentation et le marquage s'effectue
en deux étapes.

25 Quel que soit le mode de réalisation, le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un
fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3'
ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction
réactive portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

La fragmentation et/ou le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment
30 d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en

position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction nucléophile, électrophile, halogénure portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

5 La fragmentation de l'ARN s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

La fragmentation par voie enzymatique de l'ARN est réalisée par des nucléases.

La fragmentation par voie chimique de l'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un catalyseur chimique.

10 Dans ce cas, les cations métalliques sont des ions Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} et/ou Zn^{++} , et le catalyseur chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué, par exemple le N-méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant un noyau imidazole ou un analogue substitué.

La fragmentation par voie physique de l'ARN est réalisée par sonication ou par radiation.

15 Dans tous les cas de figure, le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate relié à la position 2', à la position 3' ou à la position 2'-3'-monophosphate cyclique du ribose, d'une molécule R-X, où R est constitué par le marqueur et X est l'agent de liaison entre le marqueur et l'ARN, tel qu'un groupement hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxylamine, halogénure d'alkyle, 20 phényl-méthyle halogénure, iodoacétamide, maléimide.

La présente invention consiste également en un fragment d'ARN obtenu par le procédé, selon les caractéristiques ci-dessus exposées, qui est caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte, d'une part, un seul nucléotide marqué situé à l'extrémité 3' ou 5' du fragment d'ARN et, d'autre part, au moins un autre nucléotide dont la base 25 (purique : adénine/guanine ou pyrimidique : uracyle/cytosine) est identique à celle du nucléotide marqué.

Ce fragment d'ARN comporte de 10 à 100 nucléotides, préférentiellement de 30 à 70 et préférentiellement de 40 à 60 nucléotides.

30 Selon un mode préférentiel de réalisation, le fragment d'ARN comporte au moins un nucléotide thiophosphate.

De plus, le nucléotide marqué est un nucléotide thiophosphate.

L'invention concerne l'utilisation d'un fragment d'ARN, tel que défini ci-dessus, comme sonde de détection d'un ARN et/ou d'un ADN ou d'un fragment d'ARN et/ou d'ADN.

5 L'invention concerne enfin l'utilisation d'un fragment d'ARN, tel que défini ci-dessus, comme cible marqué pouvant se fixer sur une sonde de capture.

Les figures ci-jointes montrent différents modes de synthèse de fragments d'ARN marqués selon l'invention, ainsi que les fragments ainsi obtenus. Ils représentent des modes particuliers de réalisation et ne peuvent pas être considérés
10 comme limitant la portée de la présente invention.

La figure 1 représente une vue schématique du clivage chimique d'un ARN, en présence de cations Mn^{++} et d'imidazole.

La figure 2 représente une vue schématique du clivage et marquage d'un ARN, par un marqueur portant une fonction nucléophile.

15 La figure 3 représente un marqueur utilisable avec le procédé exposé à la figure 2, ce marqueur étant constitué par de la fluorescéine-cadavérine.

La figure 4 représente un marqueur utilisable avec le procédé exposé à la figure 2, ce marqueur étant constitué par de la fluorescéine-hydrazide.

20 La figure 5 représente un marqueur halogéné utilisable avec le procédé selon l'invention.

La figure 6 représente une vue schématique de l'extrémité 3' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un phosphate naturel, Z étant un bras de couplage, également appelé bras espaceur, tel que défini dans une précédente demande de brevet de la demanderesse déposée le 1^{er}
25 août 1997 sous le numéro PCT/FR97/01445. Cette définition de Z est également vraie pour les figures 7 et 8.

La figure 7 représente une vue schématique de l'extrémité 3' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un thiophosphate.

Enfin, la figure 8 représente une vue schématique de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un phosphate naturel.

5 Exemple 1 - Préparation des ARN transcripts et ARN amplicons :

A - Préparation des ARN naturels transcripts :

Cette transcription a été réalisée sur une matrice ADN obtenue par RT-PCR sur une matrice ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Le fragment de PCR a été
10 obtenu avec les oligonucléotides « primers » suivants :
primer 5' : AACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTC
primer 3' : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACACCATTGTGCAA
TATCCCCACTGC

15 La transcription a eu lieu avec 5.10^{10} copies d'ADN, 200U de transcriptase T7 (Gen-Probe, San Diego CA) dans un tampon Tris HCl 40mM, pH = 7,5, $MgCl_2$ 20 mM, KCl 17,5 mM en présence de 1mM de chacun des ribonucléotides naturels. La réaction a eu lieu pendant une heure à 42°C. Le produit de transcription a été ensuite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en présence d'urée 7M. Après coloration
20 au bromure d'éthidium, la taille du transcrit est contrôlée et quantifiée par rapport à un standard déposé sur le gel.

B - Préparation des ARN transcripts contenant des thiophosphates :

Cette transcription a été réalisée sur une matrice ADN obtenue par RT-PCR sur
25 une matrice ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Le fragment de PCR a été obtenue avec les oligonucléotides « primers » suivants :
primer 5' : AACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTC
primer 3' : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACACCATTGTGCAA
TATCCCCACTGC

30 Le nucléotide ATP- α -thiophosphate (ATP- α -S) a été obtenu de Boehringer Mannheim France (38242 Meylan) et la CTP- α -thiophosphate (CTP- α -S) a été obtenu de N&N Life Science Products (Boston, MA - USA). L'uridine thiophosphate (UTP- α -S) a été préparée selon la méthode décrite par J. Ludwig et F. Eckstein dans J. Org.
35 Chem. 1989, 54, 631-635.

La transcription a eu lieu avec 5.10^{10} copies d'ADN, 200U de transcriptase T7 (Gen-Probe, San Diego CA) dans un tampon Tris HCl 40mM, pH = 7,5, MgCl₂ 20 mM, KCl 17,5 mM en présence de 1mM des ribonucléotides. Le nucléotide thiophosphate (A, C ou U) a été utilisé dans une proportion de 30, 70 ou 100%, venant en substitution du nucléotide naturel. La réaction a eu lieu pendant une heure à 42°C. Dans chaque cas, le produit de transcription a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en présence d'urée 7M. Après coloration au bromure d'éthidium, la taille du transcrit est contrôlée et quantifiée par rapport à un standard déposé sur le gel. Pour les essais de marquage pendant le clivage, les transcripts contenant 70% du nucléotide thiophosphate ont été utilisés.

C - Préparation des amplicons naturels :

Les amplicons naturels (ARN simple brin) sont préparés en utilisant la TMA développée par Gen-probe (San Diego, CA). Le brin d'ARN amplifié correspond à la séquence 16S des ribosomes de *Mycobacterium tuberculosis*. Les amplicons ont été obtenus en utilisant un milieu réactionnel (100µl) défini comme suit :

- 40 mM tris HCl à pH = 7,5 ;
 - 20 mM MgCl₂ ;
 - 17,5 mM KCl ;
 - 1 mM de chacun des désoxynucléotides naturels, A, C, G et T ;
 - 4 mM de chacun des ribonucléotides naturels A, C, G et U ;
 - 2000 unités de transcriptase T7 (Gen-probe, San Diego CA) ;
 - 2500 unités de RT (Gen-probe, San Diego CA) ;
 - 30 pmole de chacun des primers 5' et 3' suivants :
- Primer 5' : GAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTC
 Primer 3' : TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACACCATTGTGCAATATTC
 CCCACTGC ;
- 10^6 copies de l'ARN cible (16S de *Mycobacterium tuberculosis*).

La réaction a lieu à 42°C pendant 1 heure. Le produit de TMA est ensuite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en présence d'urée 7M. Après coloration au bromure d'éthidium, la taille du transcrit est contrôlée et quantifiée par rapport à un standard déposé sur le gel.

D - Préparation des amplicons contenant des thiophosphates :

Les amplicons contenant des thiophosphates (ARN simple brin) sont préparés en utilisant la TMA développée par Gen-probe (San Diego, CA). Le brin d'ARN amplifié correspond à la séquence 16S des ribosomes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Les amplicons ont été obtenus en utilisant un milieu réactionnel (100µl) défini comme suit :

- 40 mM tris HCl à pH = 7,5 ;
 - 20 mM MgCl₂ ;
 - 5 - 17,5 mM KCl ;
 - 1 mM de chacun des désoxynucléotides naturels A, C, G, T ;
 - 4 mM de chacun des ribonucléotides naturels A, C, G et U. Le nucléotide thiophosphate (A, C ou U) est utilisé dans une proportion de 30, 70 ou 100% venant en substitution du nucléotide naturel ;
 - 10 - 2000unités de transcriptase T7 (Gen-probe, San Diego CA) ;
 - 2500 unités de RT (Gen-probe, San Diego CA) ;
 - 30 pmole de chacun des primers 5' et 3' :
- Primer 5' : GAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTC,
- Primer 3' : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACACCATTGTGCAA
- 15 TATCCCCACTGC ;
- 10⁶ copies d'ARN cible (16S de *Mycobacterium Tuberculosis*).

- La réaction a lieu à 42°C pendant 1 heure. Le produit de TMA est ensuite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en présence d'urée 7M.
- 20 Après coloration au bromure d'éthidium, la taille du transcrit est contrôlée et quantifiée par rapport à un standard déposé sur le gel.

Exemple 2 - Clivage chimique des ARN :

- 25 Le clivage chimique des ARN est souvent catalysé par des cations métalliques (Mn⁺⁺, Mg⁺⁺ ...) qui, en se liant au groupement phosphate, neutralisent la charge négative de l'oxygène et facilite ainsi l'attaque nucléophile sur le phosphate par l'hydroxyle en position 2' du ribose.

- Cette attaque nucléophile peut être renforcée par la présence de molécules qui sont donneurs et accepteurs de protons, telles que le noyau imidazole (R. Breslow et R. Xu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1201-1207, 1993), comme cela est bien représenté dans la figure 1.
- 30

Le clivage peut être réalisé à différentes températures et dans différentes conditions. Selon le descriptif qui va suivre, deux types de clivages différents ont été réalisés.

Il peut y avoir un clivage à 65°C. Dans ce cas, les transcrits ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*, ci-après appelée *Mycobactéries*, qui comportent 330 nucléotides (66 pmoles), sont incubés dans une solution aqueuse d'imidazole (30mM) et de chlorure de manganèse (30mM) à 65°C pendant 30 min. Le volume totale de la solution de clivage est de 100 µl. L'ARN clivé est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide (6X, urée 7M) et coloré au bromure d'éthidium.

Il peut également y avoir un clivage à 95°C. Alors, les transcrits ARN 16S de 330 nucléotides (66 pmoles) *Mycobactéries* sont incubés dans une solution aqueuse de chlorure de magnésium (30mM) à 95°C pendant 45 min. Le volume totale de la solution de clivage est de 100 µl. L'ARN clivé est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide (6X, urée 7M) et coloré au bromure d'éthidium.

Dans les deux types de clivage, l'analyse sur gel montre la disparition du produit de départ et l'apparition de plusieurs fragments plus courts, dont la population la plus importante a une taille voisine de 50 nucléotides.

Ce sont ces deux protocoles qui ont été utilisés pour introduire un marqueur fluorescent sur la chaîne d'ARN pendant son clivage.

Exemple 3 - Marquage pendant le clivage par introduction de marqueurs portant une fonction nucléophile :

Une fonction plus nucléophile que l'hydroxyle, en position 2' du ribose, peut attaquer le phosphate neutralisé et permettre ainsi la clivage de la chaîne d'ARN en générant des fragments liés à cette fonction, via le groupement phosphate. Selon la figure 2, cette fonction peut être liée à un marqueur pour générer des fragments d'ARN marqués.

La fluorescéine-cadavérine, exposée en figure 3, portant une fonction amine et la fluorescéine-hydrazide, détaillée en figure 4, portant une fonction hydrazide ont été utilisées pour marquer un ARN 16S (330 nucléotides) de *Mycobactéries* pendant le clivage à 65°C.

5 La fluorescéine cadavérine et la fluorescéine hydrazide ont été solubilisées dans de la DMF à une concentration finale de 7,5 mM. Elles proviennent de chez Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

A la cible d'ARN 16S (66 pmoles) en solution dans le tampon de clivage à 65°C (exemple 1), 1 µl de la solution de marqueur (7,5mM dans DMF) a été ajouté. Après
10 incubation à 65°C pendant 30 minutes, chaque produit de réaction a été hybridé, détecté et analysé sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur. Ces puces sont conçues pour le reséquençage de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Dans le cas la fluorescéine cadavérine ou la fluorescéine hydrazide, la
15 séquence a été retrouvée à 66%. Ceci indique que dans chaque cas le marqueur a été introduit pendant le clivage générant ainsi des fragments fluorescents et détectables.

Exemple 4 - Marquage pendant le clivage via un marqueur portant un halogénure de méthyle :

20

Il est connu qu'un monophosphate peut être substitué par un marqueur portant un groupement phényl-méthyle halogénure (Voir T. Furuta et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 3139- 3142, 1993). La 5-bromo-fluorescéine, représentée à la figure 5, fait partie de cette catégorie de marqueurs halogénés.

25

Sachant que la réaction de clivage libère des extrémités 3'-monophosphate cyclique, en équilibre avec les formes ouvertes, l'étape de clivage peut servir pour attacher un marqueur sur les groupements phosphate en 3' des fragments ARN.

1°) Marquage de l'ARN non modifié :

Des cibles ARN 16S (330 nucléotides) de *Mycobactéries* ont été préparées par transcription, comme décrit dans l'exemple 1. La 5-bromo-fluorescéine a été obtenue chez Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

5 A la cible ARN 16S (66 pmoles) en solution dans le tampon de clivage à 65°C (exemple 1), on ajoute 2,85 µl de la solution de marqueur 5-bromo-fluorescéine (23,5 mM dans DMF).

Après incubation à 65°C pendant 30 minutes, le produit de réaction a été hybridé, détecté et analysé sur puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur. Ces puces sont conçues pour le reséquençage de
10 la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. La séquence a été reséquencée à 79% par cette technique de marquage. Ceci indique que dans chaque cas le marqueur a été introduit pendant le clivage générant ainsi des fragments fluorescents et détectables.

La même expérience a été répétée en utilisant l'oxyde d'argent (Ag₂O), comme
15 catalyseur de la réaction entre le marqueur bromé et le groupement phosphate. A une concentration de 1mM d'oxyde d'argent, le pourcentage des bases rappelées était de 92%. Ceci montre que le marquage de l'ARN pendant le clivage peut être optimisée en utilisant des agents chimiques capables de catalyser la réaction entre le marqueur bromé et les groupements phosphates à l'extrémité 3'.

20

2°) Marquage de l'ARN contenant des groupements thiophosphates :

Des cibles ARN 16S (330 nucléotides) *Mycobactéries* ont été produits par des réactions de transcription où 70% de l'adénosine tri-phosphate (ATP) a été remplacée par l'ATP-α-thio (Boehringer Mannheim France, 38242 Meylan) (Voir exemple 1).

25 A la cible d'ARN-thiophosphate 16S (66 pmoles) en solution dans le tampon de clivage à 65°C (exemple 1), on ajoute 2,85 µl de la solution de marqueur 5-bromo-fluorescéine (23,5 mM dans DMF). Après incubation à 65°C pendant 30 minutes, le produit de réaction a été hybridé, détecté et analysé sur puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur. La séquence a été
30 reséquencée à 99% par cette technique de marquage. Ce pourcentage de reséquençage,

plus élevé que dans le cas des ARN naturels, s'explique par la réactivité plus importantes des groupements thiophosphates en 3' des fragments produits par le clivage.

Il est important de noter que ce pourcentage de reséquençage est celui obtenu
5 par la technique classique utilisée par Affymetrix et qui basée sur l'incorporation de l'uridine directement marquée par la fluorescéine (UTP-fluorescéine).

Même si l'ensemble des exemples a trait à un marquage de l'extrémité 3' des fragments d'ARN, il est tout à fait possible de prévoir un clivage qui libère le
10 phosphate ou le thiophosphate situé en position 5' de l'ARN. Ainsi dans « Molecular cloning - A laboratory manual » de Sambrook, Fritsch et Maniatis (seconde édition pages 5.10 et 5.11), il est prévu d'utiliser des enzymes de restriction (*Eco* RI) qui clivent chaque brin d'un ADN en au moins deux fragments de manière à ce que le phosphate libéré soit en position 5' du fragment amont.

REVENDICATIONS

1. Procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel, caractérisé en ce qu'il consiste :

- 5 - à fragmenter l'ARN, et
 - à marquer l'extrémité 3' et /ou 5' de chaque fragment dudit ARN.

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le marquage de l'extrémité 3' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment constituant l'extrémité 3' de l'ARN de départ, et/ou que le marquage de l'extrémité 5' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment constituant l'extrémité 5' de l'ARN de départ.

10

3. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la fragmentation et le marquage s'effectue en une étape.

15

4. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la fragmentation et le marquage s'effectue en deux étapes.

20 5. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction réactive portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

25

6. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la fragmentation et/ou le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction nucléophile.

électrophile, halogénure portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

7. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce
5 que la fragmentation de l'ARN s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

8. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par
voie enzymatique de l'ARN est réalisée par des nucléases.

10 9. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par
voie chimique de l'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un
catalyseur chimique.

10. Procédé, selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cations
15 métalliques sont des ions Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} et/ou Zn^{++} , et que le catalyseur
chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué, par exemple le N-
méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant
un noyau imidazole ou un analogue substitué.

20 11. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par
voie physique de l'ARN est réalisée par sonication ou par radiation.

12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce
que le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation,
25 sur le phosphate relié à la position 2', à la position 3' ou à la position 2'-3'-
monophosphate cyclique du ribose, d'une molécule R-X, où R est constitué par le
marqueur et X est l'agent de liaison entre le marqueur et l'ARN, tel qu'un groupement
hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxylamine, halogénure d'alkyle, phényl-méthyle
halogénure, iodoacétamide, maléimide.

13. Fragment d'ARN obtenu par le procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte, d'une part, un seul nucléotide marqué situé à l'extrémité 3' ou 5' du fragment d'ARN et, d'autre part, au moins un autre nucléotide dont la base (purique : adénine/guanine ou pyrimidique : uracyle/cytosine) est identique à celle du nucléotide marqué.

14. Fragment d'ARN, selon la revendication 13, caractérisé par le fait qu'il comporte de 10 à 100 nucléotides, préférentiellement de 30 à 70 et préférentiellement de 40 à 60 nucléotides.

10

15. Fragment d'ARN, selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte au moins un nucléotide thiophosphate.

16. Fragment d'ARN, selon la revendication 15, caractérisé par le fait que le nucléotide marqué est un nucléotide thiophosphate.

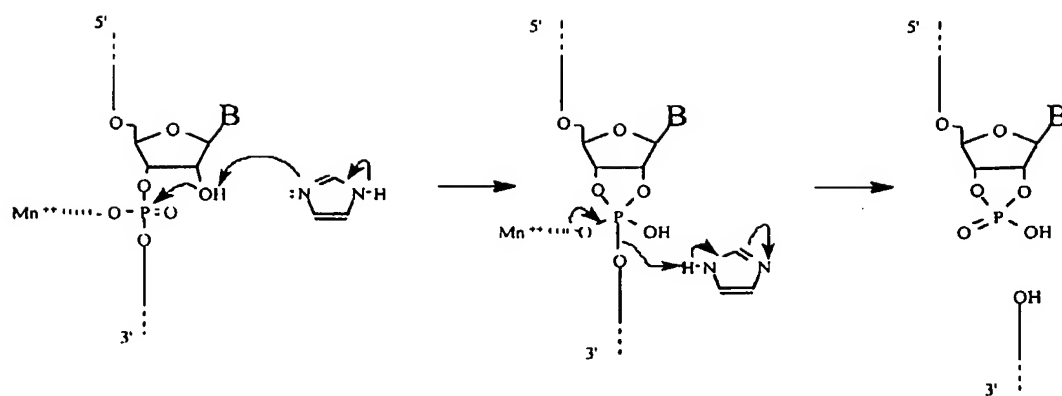
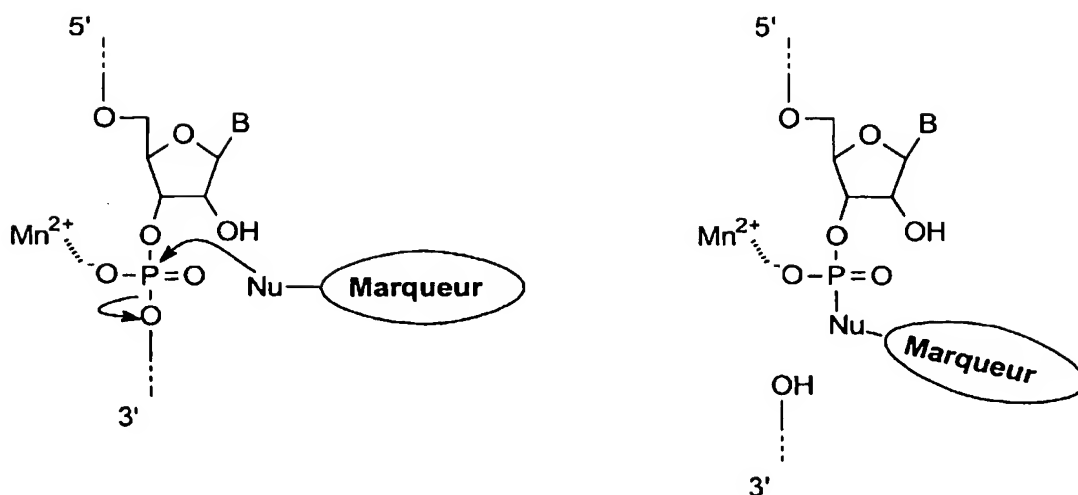
15

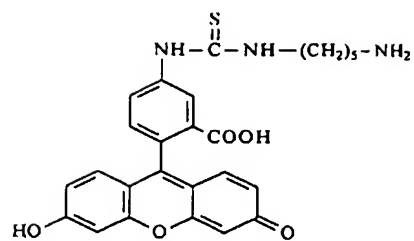
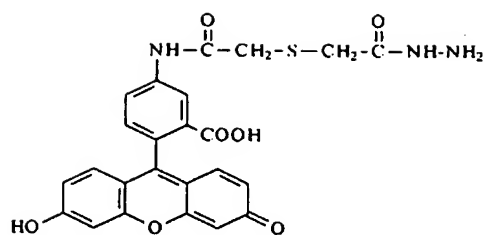
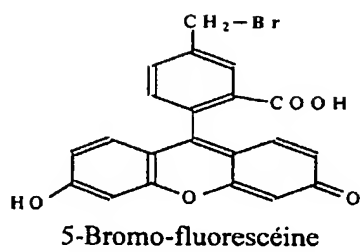
17. Utilisation d'un fragment d'ARN, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, comme sonde de détection d'un ARN et/ou d'un ADN ou d'un fragment d'ARN et/ou d'ADN.

20

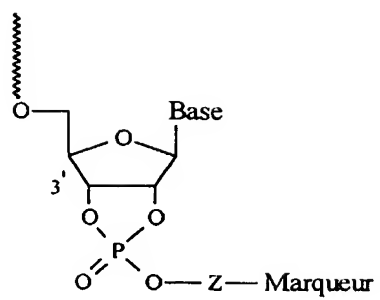
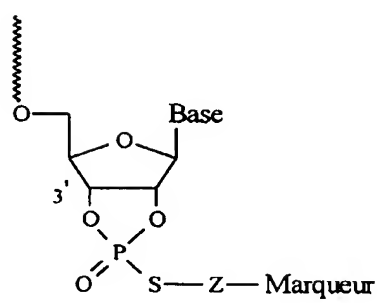
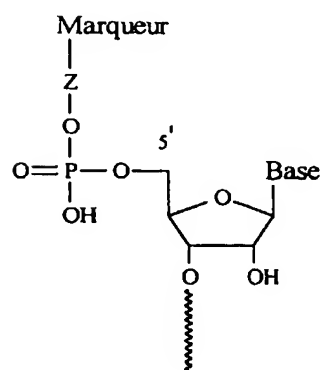
18. Utilisation d'un fragment d'ARN, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, comme cible marqué pouvant se fixer sur une sonde de capture.

1 / 3

Fig. 1Fig. 2

2 / 3Fig. 3Fig. 4Fig. 5

3 / 3

Fig. 6Fig. 7Fig. 8

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2780059

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 560080
FR 9807870

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 88 04300 A (UNIVERSITY PATENTS INC) 16 juin 1988 * revendications 67,68 * ---	1,2,4,5, 7,8,13, 14,17,18
A	WO 93 16094 A (CHROMAGEN INC) 19 août 1993	1,17,18
X	* revendications 1,2,5-8 * ---	13-16
A	US 5 684 149 A (MORROW JANET R) 4 novembre 1997	1,9,10, 17
X	* colonne 6, ligne 21-33; figure 5 * ---	13,14
A	DE 39 10 151 A (LINDL TONI DR ;SELIGER HARTMUT PROF DR (DE); ORTIGAO FLAVIO RAMALH) 4 octobre 1990	1,17,18
X	* revendications 1,2 * ---	13,14
A	EP 0 567 841 A (MERCK PATENT GMBH) 3 novembre 1993	1,17,18
X	* le document en entier * ---	13,14
X	US 5 317 098 A (MILLAR SHARON L ET AL) 31 mai 1994 * revendications 1-18 * ---	13,14
A	WO 98 11104 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 mars 1998 * revendications 1-16 * ---	1,13,17, 18
A	WO 96 28460 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;MUEHLEGGGER KLAUS (DE); ELTZ HERBERT VON) 19 septembre 1996 * revendications 1-12 * ---	1,13,17, 18
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 avril 1999		Scott, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : thèse ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2780059

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 560080
FR 9807870

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	GREISEN ET AL: "PCR probes and primers for the 16S rRNA of most species of pathogenic bacteria found in Cerebrospinal fluid" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 2, février 1994, pages 335-351, XP002080618 * abrégé *	1,13,17, 18
A	WO 95 03142 A (BIO MERIEUX) 2 février 1995 * revendications 1,5-23 *	1,13,17, 18
A	WO 98 05766 A (GUILLOU BONNICI FRANCOISE ;BIO MERIEUX (FR); HOANG ANTOINE (FR); L) 12 février 1998 * le document en entier *	1,13,17, 18
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 avril 1999		Scott, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)